

短 報

イルカにおけるハプトグロビン値と肺膿瘍の1症例

相馬亜耶[†] 菅原 健 森山泰穂青森県東青地域県民局地域農林水産部青森家畜保健衛生所
(〒030-0134 青森市大字合子沢字松森 395-26)

(2019年3月1日受付・2020年3月19日受理)

要 約

青森県内水族館で飼育されているイルカのハプトグロビン (Hp) を改良ヘモグロビン結合アッセイ (HBA) で測定したところ、臨床症状や他の炎症マーカーが異常を呈さないバンドウイルカと異常が認められたバンドウイルカの Hp 平均値は各々 $2,119\mu\text{g/ml}$, $7,495\mu\text{g/ml}$ で有意差 ($P<0.01$) があり, Hp はイルカにおいても炎症マーカーとなることが示唆された. また, 肺膿瘍死亡例では, A/G 比や赤血球沈降速度の悪化より早く Hp 値が $8,157\mu\text{g/ml}$ に増加したことから, 肺炎の早期診断に役立つ可能性があると考えられた.

——キーワード: イルカ, ハプトグロビン, 肺炎.

-----日獣会誌 73, 591~595 (2020)

ハプトグロビン (Hp) とは, 細菌感染やストレスにより肝臓で産生される急性期蛋白の一つで, リポ多糖により誘導された IL-1 や IL-6 等のサイトカインや, ストレスにより増加したグルココルチコイドが肝細胞における Hp 産生を増加させると考えられている [1, 2]. Hp には, 炎症により生じた遊離ヘモグロビンと結合し, 体内から鉄の流出を防ぐ働きがある [1-3]. 家畜の Hp は以前から測定されており, 牛では乳房炎, 子宮炎, 呼吸器病等の急性炎症で上昇することが知られている [4, 5]. 一方, イルカにおける測定の報告は少ないが, Cray ら [6] は健康なバンドウイルカの Hp 基準範囲は $0\sim 370\mu\text{g/ml}$, Segawa ら [7] は健康なバンドウイルカの Hp 平均値 \pm 標準偏差 (最小値~最大値) $\mu\text{g/ml}$ は $580\pm 550(0\sim 1,560)\mu\text{g/ml}$ と報告している.

過去に県内水族館で飼育されていたバンドウイルカ (26頭) の死亡原因を分類し, 図1に示した. 肺炎が46%と最も多く, 診断と治療を早期に実施することが重要と考えられる. しかし, イルカにおいては家畜のように聴診やX線検査等の検査ができないため, 肺炎を異常な呼吸臭等の臨床症状や一般的な炎症マーカーの数値から判断せざるを得ず, 生前診断が難しいことから, 診断の補助となる新たな検査を模索していた.

そこで, まず, 安価で継続的に実施可能な Hp 測定法

として乳牛で利用されている中村ら [4] の改良ヘモグロビン結合アッセイ (HBA) を用い, 県内水族館で飼育されているイルカの Hp を測定した. また, ウェスタンブロット (WB) で分子量を確認し, さらに改良 HBA との相関を検討した. 次に Hp のイルカの肺炎の早期診断の指標としての有用性を検討するため, 臨床症状や他の炎症マーカーが異常を呈さないイルカ (以下, 健康イルカ) と異常が認められたイルカ (以下, 異常イルカ) の Hp を測定し, Hp がイルカにおける炎症マーカーとなり得るか検討するとともに, 肺膿瘍を呈し死亡したイルカの Hp の測定値と他の炎症マーカーとの比較

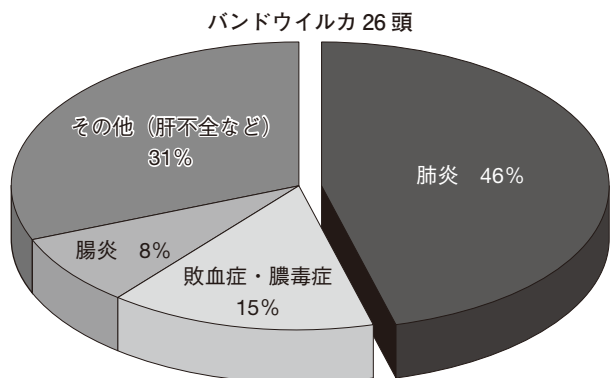


図1 県内水族館のバンドウイルカの死亡原因の分類

[†] 連絡責任者(現所属): 相馬亜耶 (青森県農林水産部畜産課)

〒030-8570 青森市長島1-1-1

☎ 017-734-9498 FAX 017-734-8144

E-mail: aya_soma@pref.aomori.lg.jp

検討を行った。

材料及び方法

改良 HBA：中村ら [4] の方法で実施した。標準血清には SRID (ウシ・ハプトグロビン定量用キット「ウシ Hp プレート—エコスチェック」, (株)メタボリックエコシステム研究所, 宮崎) により Hp 濃度を決定した炎症牛の血清を用いた。

WB：供試動物はバンドウイルカ 3 頭で, 材料は平成 28 年 9~10 月に採血した血清のうち, Hp 値がそれぞれ 114, 939, 6,157 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の 3 検体を用いた。まず, SDS-ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) (Mini PROTEAN TGX ゲル 4-20%, BioRad Laboratories, U.S.A.) によりタンパク質を分離し, 転写膜 (Immun-Blot PVDF membrane, BioRad Laboratories, U.S.A.) に転写した。一次抗体には Anti-牛 Hp Rabbit IgG (国研農研機構動物衛生研究部門, 茨城) を, 二次抗体には Anti-Rabbit IgG-Goat IgG-HRP (Invitrogen, Carlsbad, U.S.A.) を用いて抗原抗体反応を行い, HRP 検出試薬 (Immobilon Western, Millipore, U.S.A.) を用いて検出した。

さらに平成 28 年 4 月~29 年 1 月にバンドウイルカ 6 頭から採血した血清のうち, Hp 不検出から 12,371 $\mu\text{g}/\text{ml}$ までの血清を段階的に 20 検体選び, 上記と同様に WB を実施し定量した。

改良 HBA と WB の測定値の関係はピアソンの積率相関分析により, 回帰式は最小二乗法により算出した。

健康イルカと異常イルカの Hp 値の検討：供試動物はバンドウイルカ 6 頭, カマイルカ 4 頭で, 採血時の血液検査データから白血球数 10,000/ μl 以下かつ赤血球沈降速度 (以下, 血沈) 1mm 未満及び A/G 比 1.0 以上である健康イルカと, 白血球数 12,000/ μl 以上かつ血沈 1mm 以上, A/G 比 1.0 未満である異常イルカに振り分けた。白血球数は全自動血球計数器 (MEK-6550, 日本光電(株), 東京) にて測定した。血沈は 3.8% クエン酸 Na 加真空採血管 (ベノジェクト II 真空採血管, テルモ(株), 東京) にて得た全血を用い, 用手法で計測した。A/G 比は動物用臨床化学分析装置 (富士ドライケム 3000V, 富士フイルムメディカル(株), 東京) で TP 及び Alb を測定した後, Glob を算出し A/G 比を割り出した。

材料は, 各個体の平成 26 年 5 月~平成 28 年 7 月にかけて採血されていた保存血清を用いた。

統計解析は, 健康バンドウイルカ及び異常バンドウイルカの Hp 値の比較に *t* 検定を用いた。

肺膿瘍死亡例の Hp 値の検討：供試動物は, 死亡後に肺膿瘍と診断されたバンドウイルカの雄 1 頭で, 導入後の経過と病性鑑定成績については次のとおりである。平成 16 年に和歌山県太地町から導入, 平成 20 年から繰

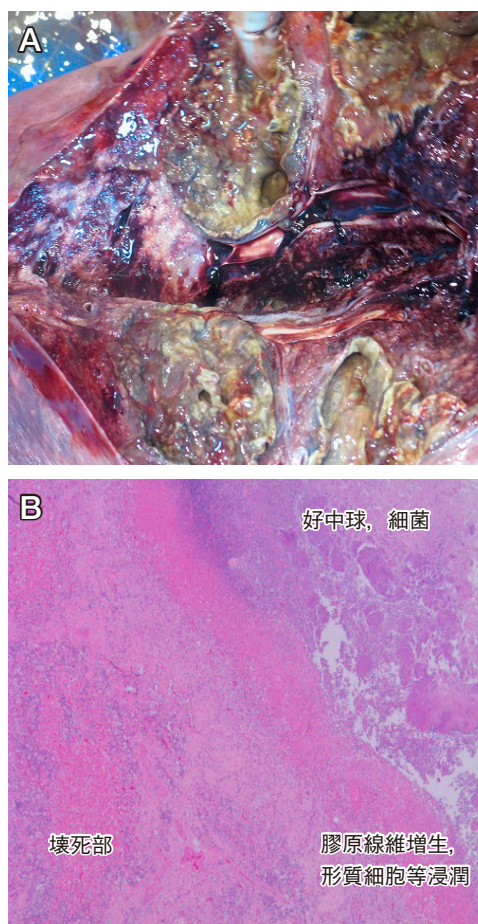


図2 肺膿瘍死亡例の病理所見

A: 肺の化膿性病変部

B: 膿瘍周囲の器質化 (HE 染色)

り返し抗菌薬を投与していたが, 平成 26 年 12 月 17 日に死亡した。死亡時の推定年齢は 12 歳, 体重は 225kg であった。病理学的検査では, 肉眼所見として肺の退縮不全と肝変化, 左葉に手拳大の膿瘍が 2 個認められた。膿瘍病変部の組織所見としては図 2 に示すとおり, 細菌塊を伴う化膿性炎症とその周囲の器質化が認められた。細菌学的検査では, *Escherichia coli*, *Vibrio alginolyticus*, *Aerococcus viridians* が分離された。

Hp 測定用材料としては, 本症例の平成 26 年 5~12 月の保存血清を用いた。白血球数, 血沈, A/G 比についても前述と同様に測定し, Hp の推移と比較した。

成 績

WB：Hp 値 939 及び 6,157 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の 2 検体において, 約 35kDa のバンドが認められた (図 3)。さらに, 改良 HBA と WB の間に強い相関 ($r=0.8376$, $P<0.01$) が認められた (図 4)。

健康イルカと異常イルカの Hp 値の検討：分類の結果, 健康バンドウイルカ 4 頭, 健康カマイルカ 4 頭, 異常バンドウイルカ 2 頭であった。なお, 異常カマイルカ

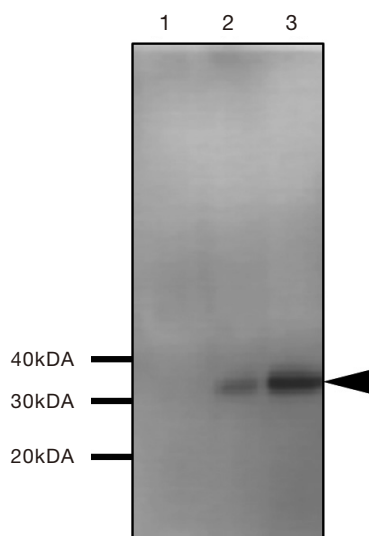


図3 WB
各サンプルのHp値は、
1: 114 $\mu\text{g/ml}$,
2: 939 $\mu\text{g/ml}$,
3: 6,157 $\mu\text{g/ml}$,
矢頭は約35kDaのイルカHp

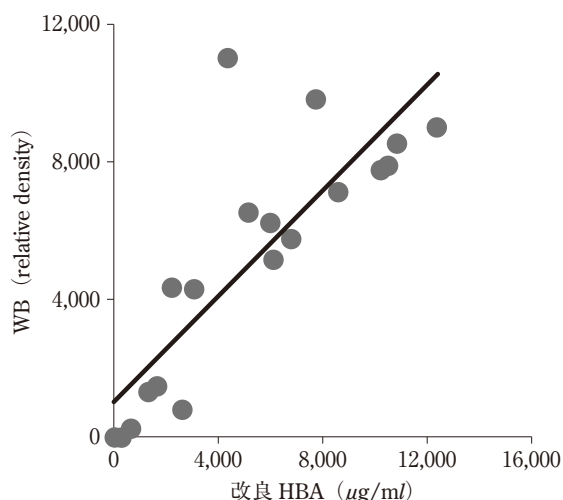


図4 改良HBAとWBの比較
回帰式 $y=0.7664x+1029.6$
 $r=0.8376$, $P<0.01$, $n=20$

に該当する個体はいなかった。

健康イルカの個体別のHp値を図5に示した。健康バンドウイルカ2, 3, 4と健康カマイルカ1, 2, 3のHp値0~2,862 $\mu\text{g/ml}$ を示した。健康バンドウイルカ1は1,777~6,738 $\mu\text{g/ml}$ 、健康カマイルカ4は439~4,595 $\mu\text{g/ml}$ を示した。

健康及び異常イルカのHp値を図6に示した。Hp平均値 \pm 標準偏差(最小値~最大値) $\mu\text{g/ml}$ は健康バンドウイルカが2,119 \pm 2,119(0~6,738) $\mu\text{g/ml}$ 、異常バンドウイルカが7,496 \pm 1,334(5,654~10,819) $\mu\text{g/ml}$ 、健康カマイルカが1,062 \pm 1,495(0~4,595) $\mu\text{g/ml}$ で

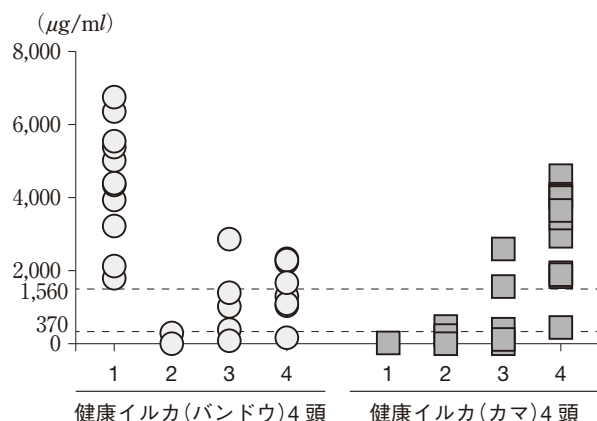


図5 健康イルカのHp値(個体別)

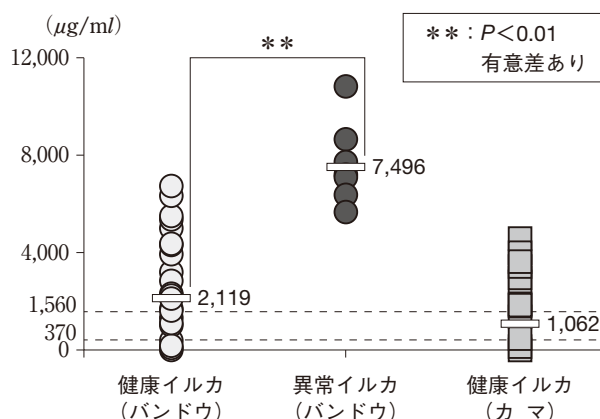


図6 健康イルカと異常イルカのHp値

あった。異常バンドウイルカは健康バンドウイルカより有意に($P<0.01$)高い値を示した。

肺膿瘍死亡例のHp値の検討: Hp値と白血球数の推移を図7に示した。Hp値は10月まで2,518~3,289 $\mu\text{g/ml}$ で推移し大きな変化を示さなかったが、11月25日に8,157 $\mu\text{g/ml}$ に増加し、その後は6,939~8,089 $\mu\text{g/ml}$ を示した。一方、白血球数は5~8月まで11,000~13,400/ μl で推移したが、10月には6,000/ μl に低下した。その後次第に増加し、12月2日には13,800/ μl に達したが、死亡当日には1,600/ μl まで低下した。

Hp値と血沈の推移を図8に示した。血沈は10月まで0mm、11月25日には5mmを示したが、12月2日の検査で40mmに増加した。

Hp値とA/G比の推移を図9に示した。A/G比は11月まで0.68~0.89で推移していたが、12月2日には0.58に低下した。

考 察

本試験では、抗牛Hp抗体を用いてWBを行ったが、Segawaら[7]の報告と同様、約35kDaのバンドが認められた。イルカ血清Hpは、今回用いた抗牛Hp抗体と交差すると考えられる。また、改良HBAとWBの間

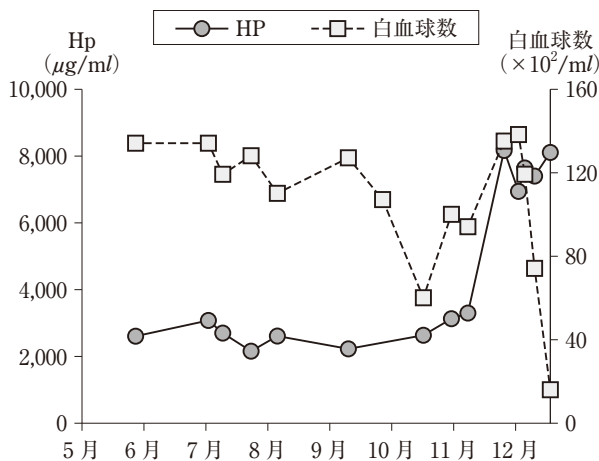


図7 死亡例のHp値と白血球数の推移

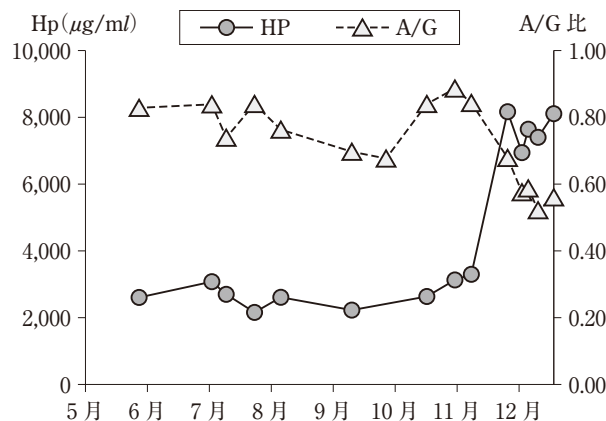


図9 死亡例のHp値とA/G比の推移

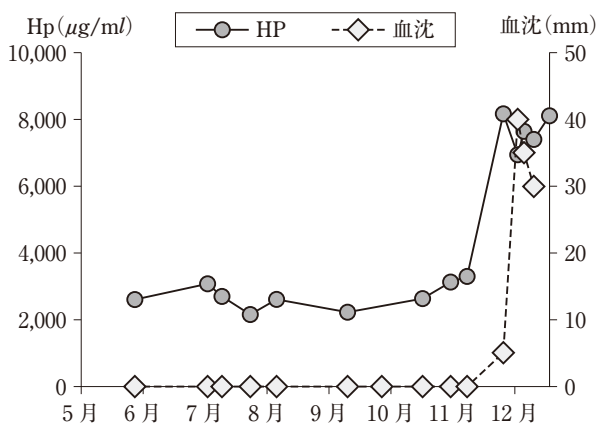


図8 死亡例のHp値と血沈の推移

に強い相関 ($r=0.8376$, $P<0.01$) が認められたことから、改良HBAがイルカのHp測定に応用できることが確認された。

健康及び異常バンドウイルカのHp平均値はそれぞれ $2,119 \pm 2,119 \mu\text{g/ml}$, $7,496 \pm 1,334 \mu\text{g/ml}$ で、両群間に有意差 ($P<0.01$) が認められた。また、異常イルカは白血球数、血沈速度、A/G比などの従来の炎症指標がすべて異常値であったことから、Hpはイルカにおいても炎症マーカーとして有用であると考えられた。

健康イルカのHp値として、Crayら [6] は $0 \sim 370 \mu\text{g/ml}$ 、またSegawaら [7] は $0 \sim 1,560 \mu\text{g/ml}$ と報告している。これらの値に比べて、本試験の健康イルカのHp値は高い傾向が認められた。特に健康バンドウイルカ1、健康カマイルカ4については、他の健康イルカと比べHp値が高く、多くが $1,500 \mu\text{g/ml}$ 以上であった。

この理由としては、既報 [6, 7] では市販のHBAキットを、本試験では改良HBAを用いていることから、測定方法が異なることから測定値に差が生じたものと考えられる。あるいは、白血球数、血沈及びA/G比等に異常が認められなくても、潜在的な炎症やストレス等のHp値を上昇させる要因が存在していた可能性もある。

たとえば、人においては肺腺癌、卵巣ガン等によってHp値が増加するとの報告や [8, 9]、加齢によってHp値が増加するとの報告がある [10]。今回は臨床上健康かつ白血球数、血沈、A/G比に異常がないイルカを健康イルカとしており、ガンの関与については不明であった。一方で、年齢については、Hpが高値を示した健康バンドウイルカ1の採血時の推定年齢は33~35歳、健康カマイルカ4は2~4歳、ほかの健康イルカは2~20歳の範囲であった。飼育下のバンドウイルカの寿命は文献によってさまざまであるが、Geraci [11] は25歳としており、健康バンドウイルカ1は高齢として差し支えないと考えられる。また、健康バンドウイルカ1は他の健康イルカと比較しても高齢であったことがHpの高値に関連している可能性があると考えられた。しかし、Hpが高値を示した健康カマイルカ4については、若齢でありHpが高値を示す要因が不明であったことから、健康イルカのHp値については、今後もさらに検証を重ね、正常範囲を確定する必要がある。

肺膿瘍死亡例では、Hp値は5~10月に $2,518 \sim 3,289 \mu\text{g/ml}$ と大きな変化を示さなかったことから、肺膿瘍を形成するような経過の長い症例では変動が小さい可能性があると考えられた。11, 12月の検査では、 $6,939 \sim 8,157 \mu\text{g/ml}$ と急激に増加し、高値で推移したことから、牛と同様にイルカにおいても急性炎症では増加するものと考えられた。

また、Hpは白血球数に連動した変化を示さなかったことから、両者を測定することで個体の状態をより正確に把握できるものと考えられた。

Hp値、血沈及びA/G比は10月まで大きな変化を示さなかったことから、5~10月は炎症反応の大きな変化はなかったと推察された。しかし、Hpが11月25日に $8,157 \mu\text{g/ml}$ に急激に増加した一方で、血沈の上昇及びA/G比の低下は、12月2日であったことから、Hpは血沈やA/G比に比べ早期に、肺の炎症の有無を推定できると考えられた。

今回の試験から Hp はイルカにおける有用な炎症マーカーであり、他の炎症マーカーと総合的に判断することにより、肺炎の早期診断に活用できることが示唆された。

一方で、臨床的に健康な個体でもストレスや加齢等で Hp 値が上昇する可能性があるため、今後もさらにデータを積み重ね、イルカの臨床診断における有用性を示していきたい。

稿を終えるに当たり、Hp の同定にご協力いただき、改良 HBA についてご助言とご指導いただいた(国研)農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門病態研究領域の宮本 亨 元生化学ユニット長に深謝する。

引用文献

- [1] 伊藤喜久：総タンパク質量，タンパク質の事典，猪飼篤他編，502，朝倉書店，東京（2008）
- [2] Meyer DJ, Harvey JW：獣医臨床検査—解釈と診断への応用，石田卓夫監訳，第2版，50-51，文永堂出版，東京（2000）
- [3] Schalm OW：血漿蛋白，獣医血液学Ⅲ，小林好作訳，675-706，医歯薬出版，東京（1980）
- [4] 中村正明，小山 毅，松井義貴，平井綱雄，南橋 昭，中田 健，横田 博，宮本 亨：ヘモグロビン結合アッセイの改良及び乳牛の分娩後における牛ハプトグロビン濃度推移，日獣会誌，65，682-688（2012）
- [5] Nazifi S, Rezakhani A, Koohimoghadam M, Ansari-Lari M, Esmailnezhad Z：Evaluation of serum haptoglobin in clinically healthy cattle and cattle with inflammatory diseases in shiraz, a tropical area in southern Iran, Bulgarian Journal of Veterinary Medicine, 11, 95-101（2008）
- [6] Cray C, Arheart KL, Hunt M, Clauss T, Leppert LL, Roberts K, McCulloch SD, Goldstein JD, Gonzalez C, Sweeney J, Stone R, Fair PA, Bossart GD：Acute phase protein quantitation in serum samples from healthy Atlantic bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*), J Vet Diagn Invest, 25, 107-111（2013）
- [7] Segawa T, Amatsuji H, Suzuki K, Suzuki M, Yanagisawa M, Itou T, Sakai T, Nakanishi T：Molecular characterization and validation of commercially available methods for haptoglobin measurement in bottlenose dolphin, Results in Immunology, 3, 57-63（2013）
- [8] Chang YK, Lai YH, Chu Y, Lee MC, Huang CY, Wu S：Haptoglobin is a serological biomarker for adenocarcinoma lung cancer by using the ProteomeLab PF2D combined with mass spectrometry, Am J Cancer Res, 6, 1828-1836（2016）
- [9] Ye B, Cramer DW, Skates SJ, Gygi SP, Pratomo V, Fu L, Horick NK, Licklider LJ, Schorge JO, Berkowitz RS, Mok SC：Haptoglobin-alpha subunit as potential serum biomarker in ovarian cancer: identification and characterization using proteomic profiling and mass spectrometry, Clin Cancer Re, 9, 2904-2911（2003）
- [10] Miura Y, Sato Y, Arai Y, Abe Y, Takayama M, Toda T, Hirose N, Endo T：Proteomic analysis of plasma proteins in Japanese semisuper centenarians, Exp Gerontol, 46, 81-85（2011）
- [11] Geraci JR：序論及び分類 生理，野生動物の獣医学，北 昂 監訳，523-525，文永堂出版，東京（1984）

Haptoglobin Value and a Case of Pulmonary Abscesses in Dolphin

Aya SOMA[†], Ken SUGAWARA and Yasuho MORIYAMA

*Aomori Prefectural Aomori Livestock Hygiene Service Center, 395-26 Matsumori, Gousizawa, Aomori, 030-0134, Japan

SUMMARY

We measured haptoglobin (Hp) of some dolphins in the aquarium in Aomori Prefecture by modified hemoglobin binding assay. The mean Hp values of healthy and unhealthy bottlenose dolphins were significantly different ($P < 0.01$) at 2,119 $\mu\text{g/ml}$ and 7,495 $\mu\text{g/ml}$, respectively. In the case of death from lung abscesses, Hp value increased to 8,157 $\mu\text{g/ml}$ prior to a decline in A/G ratio and erythrocyte sedimentation rate. These results suggest that Hp is an inflammatory marker in dolphins and may be useful for early diagnosis of pneumonia.

— Key words : dolphin, haptoglobin, pneumonia.

[†] Correspondence to (Present address) : Aya SOMA (Livestock Division, Department of Agriculture, Forestry, and Fisheries, Aomori Prefectural Government)

1-1-1 Nagashima, Aomori, 030-8570, Japan

TEL 017-734-9498 FAX 017-734-8144 E-mail : aya_soma@pref.aomori.lg.jp

J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 73, 591 ~ 595 (2020)